

**(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)**

**(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle**
Bureau international



**(43) Date de la publication internationale
25 août 2005 (25.08.2005)**

PCT

**(10) Numéro de publication internationale
WO 2005/077177 A2**

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
A01N 43/12, 43/38, 63/04, A01G 1/04

(74) Mandataire : Cabinet Barre Laforgue & Associés; 95, rue des Amidonniers, F-31000 Toulouse (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2005/000284

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Date de dépôt international : 9 février 2005 (09.02.2005)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0401282 10 février 2004 (10.02.2004) FR

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) : UNIVERSITE PAUL SABATIER TOULOUSE III [FR/FR]; 118, route de Narbonne, F-31062 Toulouse Cedex 4 (FR). CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE(C.N.R.S.) [FR/FR]; 3,rue Michel-Ange, F-75016 Paris (FR).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: MODULATORS OF THE DEVELOPMENT OF MYCHORRIZAL FUNGI WITH ARBUSCULES, AND USES THEREOF

(54) Titre : MODULATEURS DE DEVELOPPEMENT DES CHAMPIGNONS MYCORHIZIENS A ARBUSCULES, ET APPLICATIONS

(57) Abstract: The invention relates to the identification of compounds, i.e. strigolactones, which are able to stimulate the growth and/or development of mychorrizal fungi with arbuscules (MA fungus). Said compounds are, for example, natural strigolactones such as strigol, alectrol, sorgolactone, orobanchol, or the synthetic analogs GR7, GR24, Nijmegen-1, demethylsorgolactone. The invention opens up new pathways for the development of a type of agriculture which is more respectful of the environment, particularly in that it enables the implementation, on a large or small scale, of advanced mychorrhization techniques designed to increase the production of fungic inoculum, the use of MA fungi in soils or cultivation media and to intensify symbiotic interaction between said micro-organisms and cultivated plants.

(57) Abrégé : L'invention repose sur l'identification de composés, les strigolactones, ayant la capacité de stimuler la croissance et/ou le développement des champignons mycorhiziens à arbuscules (champignons MA). Ces composés sont par exemple les strigolactones naturelles strigol, alectrol, sorgolactone, orobanchol, ou leurs analogues de synthèse GR7, GR24, Nijmegen-1, démethylsorgolactone. L'invention ouvre ainsi de nouvelles voies vers le développement d'une agriculture plus respectueuse de l'environnement, en particulier en ce qu'elle permet la mise en oeuvre, à petite ou grande échelle, de techniques de mychorrhization avancées visant à optimiser la production d'inoculum fongique, l'utilisation des champignons MA dans les sols ou supports de culture, et à intensifier l'interaction symbiotique entre ces micro-organismes et les plantes cultivées.

WO 2005/077177 A2

MODULATEURS DE DEVELOPPEMENT
DES CHAMPIGNONS MYCORHIZIENS A ARBUSCULES,
ET APPLICATIONS

5 L'invention concerne la culture des végétaux terrestres et celle des champignons mycorhiziens à arbuscules. Elle vise plus particulièrement les techniques utilisées pour stimuler la croissance et le développement des champignons mycorhiziens à arbuscules et/ou pour stimuler la mycorhization et le développement des plantes d'intérêt agronomique et/ou forestier.

10 Bon nombre de plantes terrestres, dès le stade juvénile, vivent en symbiose avec des micro-organismes qui leur sont associés au niveau des racines. Parmi ces micro-organismes, les champignons mycorhiziens à arbuscules (champignons MA), aussi désignés "champignons vésiculaires et arbusculaires" (champignons VAM), établissent avec certaines plantes, dites 15 plantes hôtes, une interaction intime assurant le fonctionnement mutualiste de la symbiose. L'établissement d'une telle symbiose entre une plante et les champignons mycorhiziens est appelé mycorhization.

Les champignons MA font parti d'un groupe de champignons archaïques, les Glomeromycota, dont les ancêtres seraient à 20 l'origine des groupes modernes Ascomycota et Basidiomycota (Schüssler et al., Mycological Research, 2001, 105:1413-1421).

Sûrement présents lors de l'apparition des premiers végétaux terrestres, les ancêtres des Glomeromycota auraient contribué à l'acclimatation des végétaux au milieu terrestre, assurant aux plantes un apport en 25 eau et en sels minéraux plus efficace. Par co-évolution (bio-radiations évolutives), les champignons MA auraient acquis au cours de l'évolution l'aptitude à interagir avec un nombre croissant de plantes, dites plantes hôtes. On estime actuellement que plus de 80 % des espèces végétales terrestres sont associées aux champignons mycorhiziens à arbuscules, parmi lesquelles, des 30 espèces herbacées d'intérêt économique majeur (aussi bien des espèces

céréalières, fruitières que potagères), mais aussi des espèces ligneuses (ornementales, forestières et fruitières).

Au niveau du champignon, cette interaction se manifeste par l'apparition de structures filamenteuses, appelées hyphes, qui se propagent en tout un réseau dans le sol. L'ensemble des hyphes du champignon forme le mycélium qui correspond à la structure assimilatrice du champignon.

Simultanément, le champignon se développe aussi dans les racines de la plante hôte. Il existe donc un continuum fongique entre le sol et les tissus racinaires. Grâce au réseau mycélien extraracinaire du champignon, la plante hôte dispose d'un plus grand volume d'exploration du sol pour s'approvisionner en eau et sels minéraux. Outre l'amélioration de l'apport hydrique et minéral dont profite la plante hôte, cette association symbiotique améliorerait également sa résistance aux pathologies racinaires.

Cette alliance fonctionnelle est également bénéfique pour les champignons MA qui ne peuvent vivre qu'en association avec des racines dont ils dépendent pour leur apport en substrats carbonés. Ainsi physiquement et fonctionnellement associés à la plante hôte, ces micro-organismes se multiplient dans le sol par dissémination de propagules (spores et/ou mycélium).

Depuis quelques années, on a tenté de mettre au point des techniques de symbiose dirigée permettant d'intensifier l'interaction bénéfique entre les champignons MA et de nombreuses espèces végétales cultivées, agricoles et forestières, de façon à améliorer l'apport hydrique et minéral de ces plantes hôtes, ainsi que leur résistance aux maladies racinaires. Ces techniques de symbiose dirigée ouvriront des perspectives prometteuses pour le développement de pratiques culturales plus respectueuses de l'environnement.

En particulier, l'épandage de champignons MA sur les sols de culture optimiserait leur teneur en ces micro-organismes bénéfiques pour la plante à cultiver, et permettrait par conséquent de réduire sensiblement les quantités d'engrais, notamment chimiques, ordinairement employés pour enrichir les sols, en particulier les phosphates et les nitrates qui contribuent en grande partie à la pollution des nappes phréatiques.

Toutefois, pour qu'un tel concept puisse s'appliquer aux grandes cultures, il faudrait pouvoir disposer d'une quantité importante de ces champignons MA, et de préférence sous forme de spores, plus faciles à manipuler et à stocker. Mais à l'heure actuelle, on ne connaît malheureusement 5 aucune méthode capable de produire des spores de champignons MA en quantité suffisante pour une telle application.

De nombreuses techniques ont pourtant été proposées pour améliorer le développement et la croissance des champignons MA, notamment pour amplifier leur sporulation. Généralement basées sur une co-culture du 10 champignon en présence d'une plante hôte entière en pot, ou *in vitro* en présence seulement de racines cultivées, ces techniques n'ont jusqu'à présent donné lieu qu'à des productions de propagules en quantités relativement faibles, insuffisantes pour une application agronomique à grande échelle.

La supplémentation du milieu de co-culture en exsudats 15 racinaires, réputés être stimulateurs du développement des champignons MA, a également été envisagée (Bécard et *al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1989, 55:2320-25 ; Elias et *al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1987, 53:1928-33). Malheureusement, à l'heure actuelle, on ne dispose d'aucune méthode d'obtention 20 de ces stimulateurs autre que la récupération "passive" et lente des exsudats produits et sécrétés progressivement par les racines des plantes. Egalement, les quantités ainsi recueillies sont tout juste suffisantes pour des expérimentations en laboratoire.

Du fait de la grande complexité de composition de ces exsudats, qui renferment des milliers de molécules allant des sucres simples, 25 présents en grandes concentrations, aux molécules bien plus complexes, présentes à l'état de traces (voir notamment Walker et *al.*, *Plant Physiology*, 2003, 132:44-51) et malgré les très nombreux travaux déjà menés sur ce sujet, le(s) facteur(s) réellement impliqué(s) dans la stimulation du développement et de la croissance des champignons MA, n'a(ont) toujours pas été identifié(s).

Dans ce contexte, l'invention vise à proposer de nouveaux facteurs de stimulation du développement et/ou de la croissance des champignons MA pour remédier à la très faible disponibilité de ces organismes.

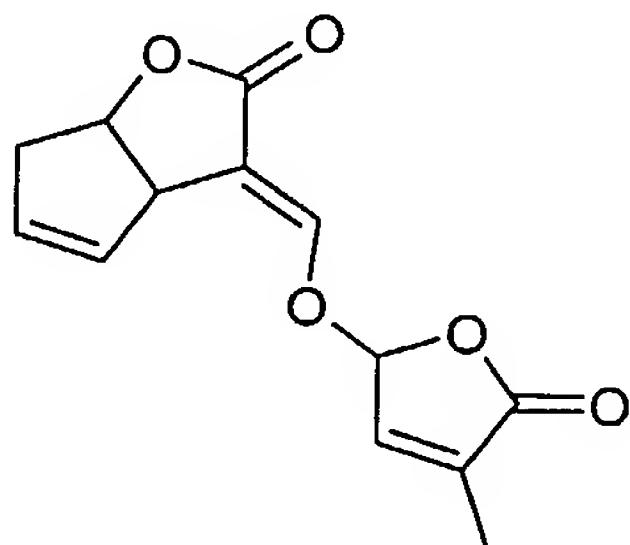
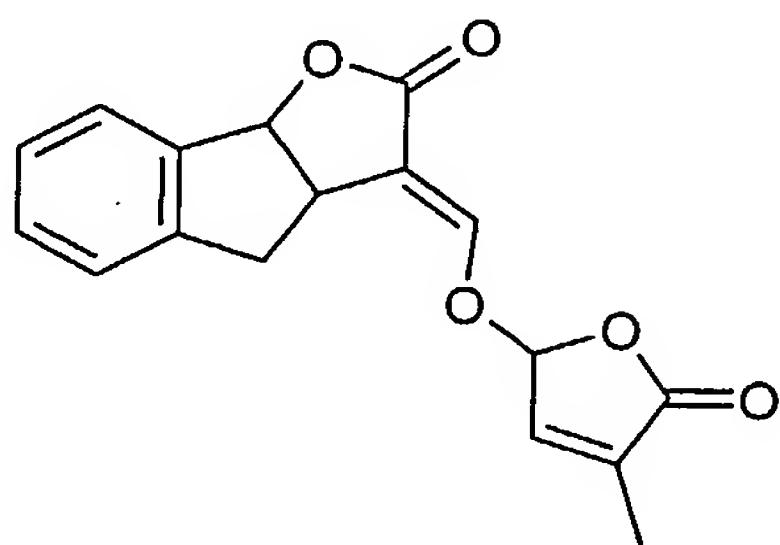
L'invention a également pour principal objectif de proposer 5 de tels facteurs de stimulation dont la disponibilité et l'accessibilité de certains d'entre eux ne constituent pas une limite quant à leur application à grande échelle, c'est-à-dire une application qui va au-delà de celle des paillasses de laboratoire ou d'une simple culture sous-serre.

En particulier, l'invention a pour intérêt d'améliorer la 10 productivité des méthodes d'obtention, notamment à l'échelle industrielle, d'inoculum de champignons MA.

Dans tout le texte, par "inoculum", on entend toute forme de champignon MA susceptible de coloniser une plante hôte : spores, hyphes, vésicules, fragments de racines mycorhizées.

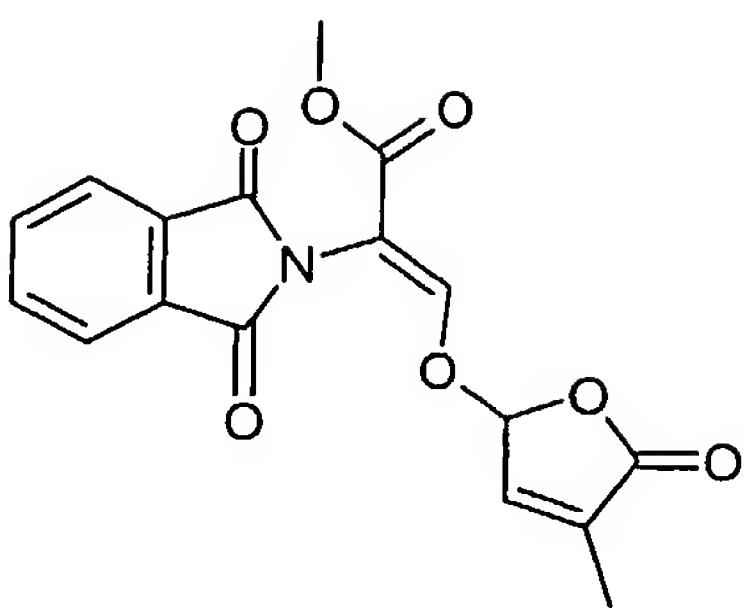
15 *In fine*, l'invention vise à améliorer les méthodes de mycorhization des plantes, notamment des plantes d'intérêt agronomique et/ou forestier, pour une culture intensive plus respectueuse de l'environnement.

Ainsi, l'invention concerne un procédé de traitement de 20 champignons mycorhiziens à arbuscules, dits champignons MA, -notamment sous forme de spores- dans lequel on place au contact des champignons MA, au moins une quantité adaptée pour pouvoir stimuler le développement et/ou la croissance desdits champignons MA, d'au moins un agent de stimulation de structure choisie parmi :

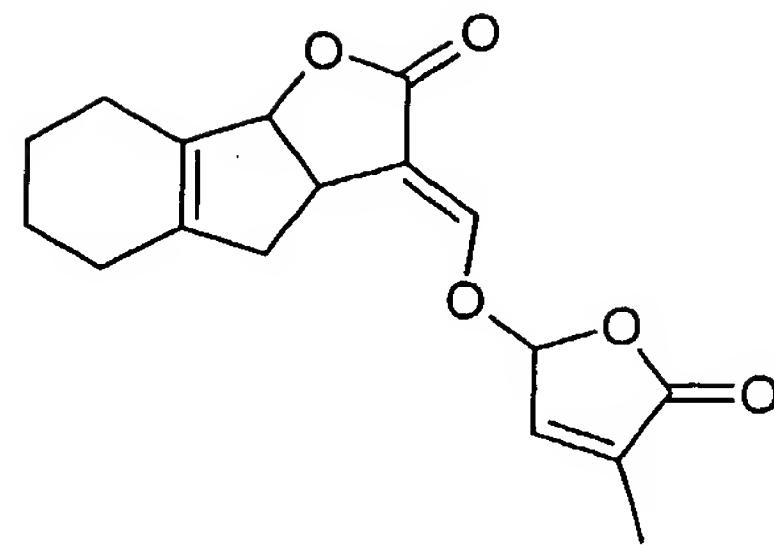


25 GR24 (Mangnus et al.,
J. Agric. Food Chem., 1992,
40(6):697-700)

GR7 (Johnson et al., Weed Res., 1976,
16:223-227)

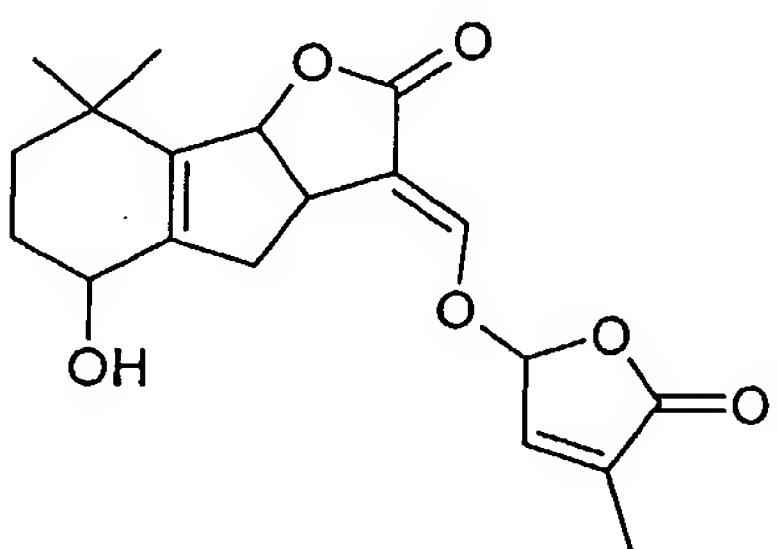


Nijmegen 1 (Nefkens et al.,
J. Agric. Food Chem., 1997,
45(6):2273-2277)

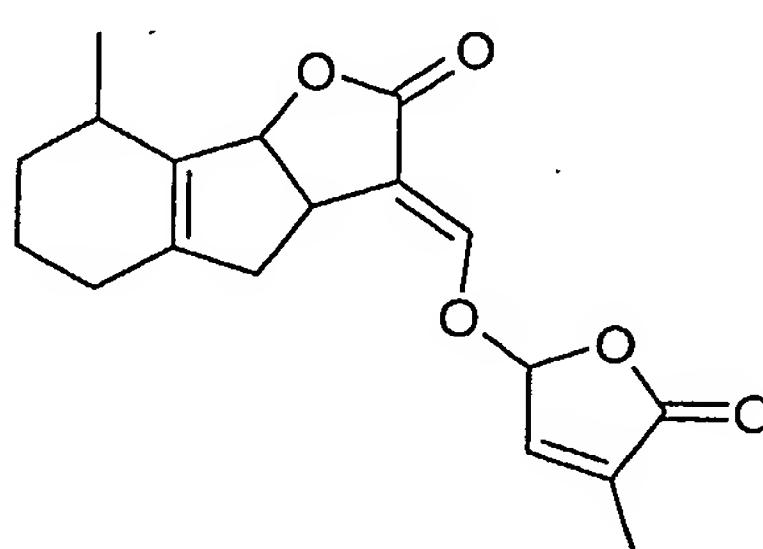


Déméthylsorgolactone (Thuring et al.,
J. Agric. Food Chem., 1997, 45(6):2278-
2283)

5

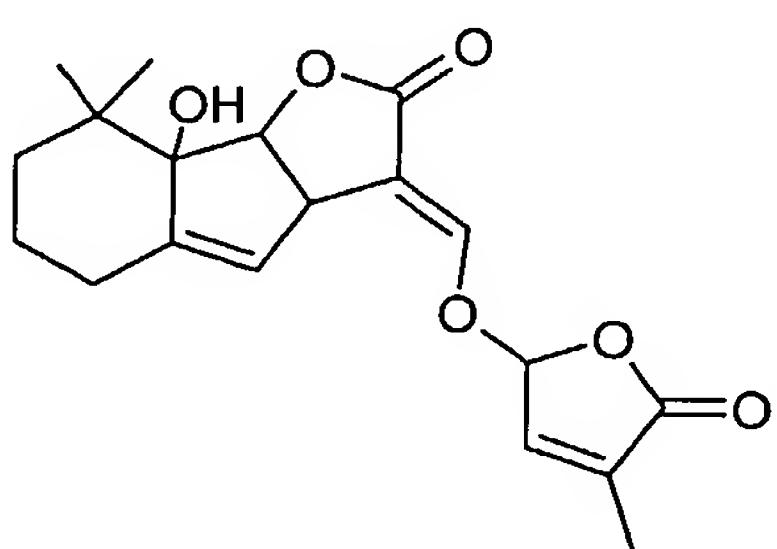


Strigol (Cook et al., Science, 1966,
1954:1189-1190 ;)

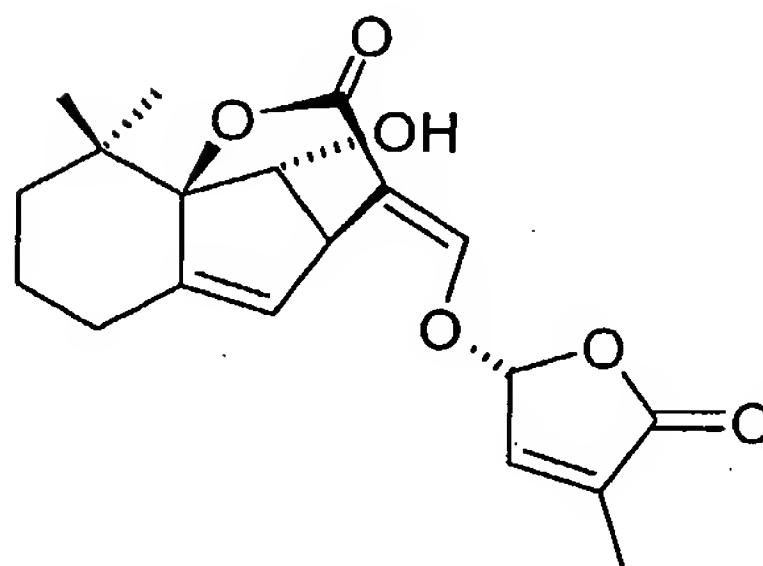


Sorgolactone (Hauck et al., J. Plant
Physiol., 1992, 139:474)

10



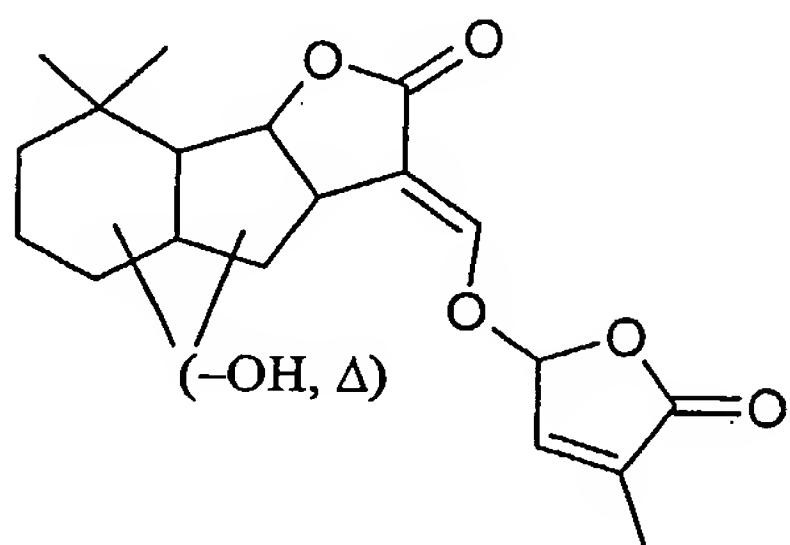
Alectrol
(Müller et al., J. Plant Physiol.,
1992, 11:77)



Alectrol

(Wigchert et al., J. Agric. Food Chem.,
1999, 47:1705-1710)

15



Orobanchol (Yokota et al.,
Phytochemistry, 1998, 49(7):1967-1973)

L'invention repose ainsi sur l'identification de composés de structure définie, ayant la capacité de stimuler la croissance et le développement des champignons mycorhiziens à arbuscules. En particulier, les travaux menés par les inventeurs ont effectivement révélé que des molécules déjà connues, GR7 5 et GR24, des analogues de synthèse de composés naturels appartenant à la famille des strigolactones, pouvaient avantageusement être utilisées à d'autres fins que l'élimination de plantes parasites.

En effet, les strigolactones (comme le strigol, l'alectrol, la sorgolactone, l'orobanchol), composés naturels extraits d'exsudats racinaires de 10 différentes espèces végétales ont été initialement décrites comme des inducteurs de la germination des graines de plantes parasites des groupes *Striga* et *Orobanche* (Cook et al., Science, 1966, 1954:1189-1190 ; Cook et al., J. Amer. Chem. Soc., 1972, 94:6198-6911) particulièrement néfastes pour certaines 15 cultures d'intérêt économique majeur comme celles du sorgho, du maïs, de la canne à sucre, des fèves... Avec les strigolactones, la germination suicide, une nouvelle approche dans la lutte contre les plantes parasites a pu être envisagée.

Concrétisée avec l'émergence d'analogues de synthèse, comme GR7 et GR24, plus faciles à obtenir que les composés naturels et donc plus propices à une application à échelle industrielle, la germination suicide 20 consiste en un traitement des sols agricoles, susceptibles d'être infestés de plantes parasites, par des analogues de synthèse de strigolactones et ce, au moment où la plante à cultiver ne pousse pas encore dans lesdits sols. En disséminant lesdits analogues de synthèse, on provoque la germination des graines dormantes des plantes parasites lesquelles, n'ayant pas de plante hôte à infester, finissent par 25 mourir par manque de nutrition (Jonhson et al., Weed Research, 1976, 16:223-227).

Alors que GR7 et GR24 étaient jusqu'à présent consacrés spécifiquement et uniquement à la germination suicide des graines de plantes parasites appartenant aux groupes *Striga* et *Orobanche*, l'invention propose une 30 exploitation, jusqu'alors impensable, de ces molécules pour leur effet biologique

inattendu sur les champignons MA, des micro-organismes de phylogénie très éloignée de celle des plantes *Striga* et *Orobanche*.

De manière jusqu'alors insoupçonnée, les inventeurs ont constaté que GR7 et GR24 entraînent une stimulation de la respiration cellulaire des spores des champignons MA et permettent d'amplifier le processus biologique de la ramification des hyphes de ces champignons. En traitant les spores par GR7 et/ou GR24, les inventeurs sont ainsi parvenus à stimuler la croissance et la ramification des champignons MA. Ces deux réponses physiologiques et morphologiques sont essentielles à l'établissement de l'interaction symbiotique entre les champignons MA et leurs plantes hôtes.

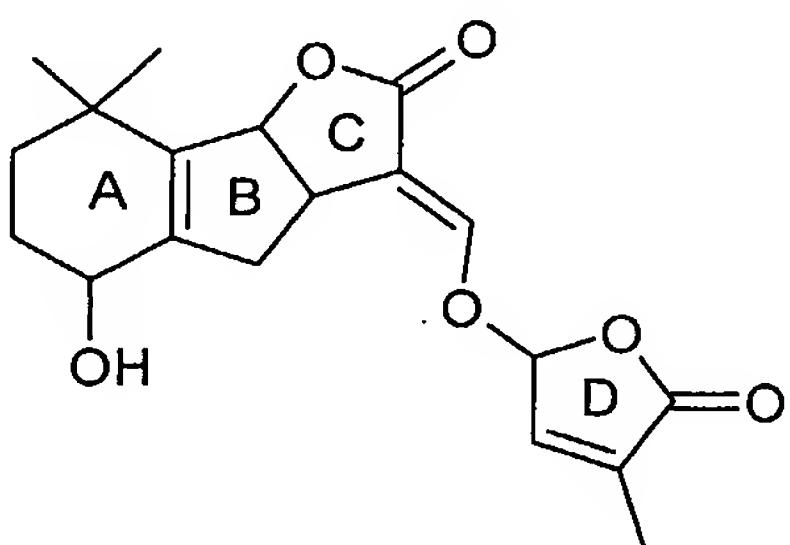
Ces travaux menés par les inventeurs permettent ainsi d'attester que l'effet de stimulation des exsudats racinaires sur le développement et la croissance des champignons MA, mis en évidence pour la première fois dans des travaux qui remontent au moins au début des années 80, provient au moins en partie des strigolactones, des composés qui, dans les exsudats racinaires, ne sont pourtant présents qu'en quantité infinitésimale. La sorgolactone (la strigolactone du sorgho), par exemple, a été isolée à partir d'exsudats racinaires recueillis à partir de 300 000 plants de sorgho, aboutissant à la purification de 5 µg de composés purifiés. Les quantités obtenues sont si faibles que la structure chimique de la sorgolactone n'a pu être définie qu'après synthèse chimique du composé et comparaison des spectres RMN. Pour la même raison, seules cinq strigolactones ont pu être caractérisées à l'heure actuelle.

L'invention repose ainsi sur le principe que des molécules de structure et de configuration particulières, notamment les molécules connues sous les appellations usuelles de GR7 et GR24, peuvent être utilisées à titre de facteurs de stimulation du développement et/ou de la croissance des champignons MA.

Le choix du facteur de stimulation du développement et/ou de la croissance des champignons MA pour la mise en oeuvre d'un procédé de traitement de champignons MA -notamment sous forme de spores- conforme à l'invention, ne se limite pas seulement à GR7 et GR24. Ce choix s'étend

également aux strigolactones en général et, en particulier, au strigol, à l'alectrol, à la sorgolactone et à l'orobanchol.

De même, et selon toute vraisemblance, l'effet recherché avec GR7 et GR24, mais également avec les strigolactones en général, sur les 5 champignons MA vient de la structure et de la configuration particulières des cycles référencés B, C, et D de ces molécules, comme ci-après indiqués avec la molécule de strigol.



Aussi, les travaux des inventeurs montrent que tout 10 composé de structure analogue à GR7, GR24 et aux strigolactones, c'est-à-dire tout composé reprenant la structure de l'enchaînement les cycles référencés B, C, et D des strigolactones (comme par exemple la déméthylsorgolactone) ou simplement leur configuration (comme par exemple le Nijmegen-1, un autre analogue de synthèse des strigolactones), peut être utilisé 15 comme agent stimulateur du développement et/ou de la croissance des champignons MA, conformément à l'invention.

Avantageusement et selon l'invention, le traitement des champignons MA, ou inoculum de champignons MA, est réalisé de préférence sur des spores ou des fragments de racines mycorhizées.

20 Avantageusement et selon l'invention, on réalise ledit traitement en présence d'une matière végétale vivante, dite plante hôte, correspondant, au moins en partie, à une partie constitutive de racine d'une plante apte à former une symbiose avec des champignons MA.

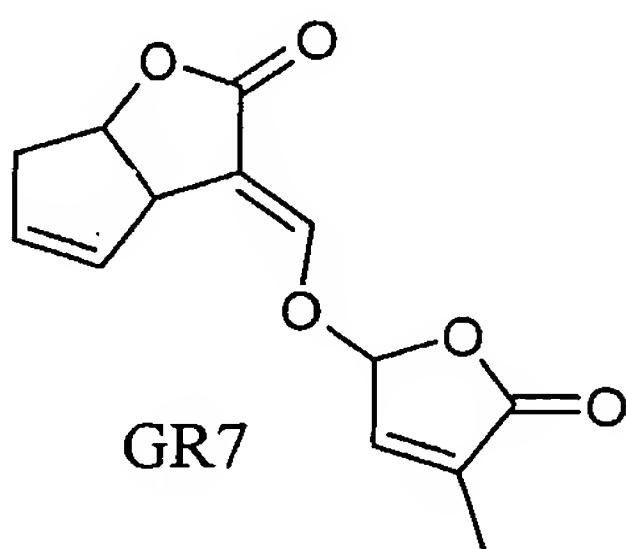
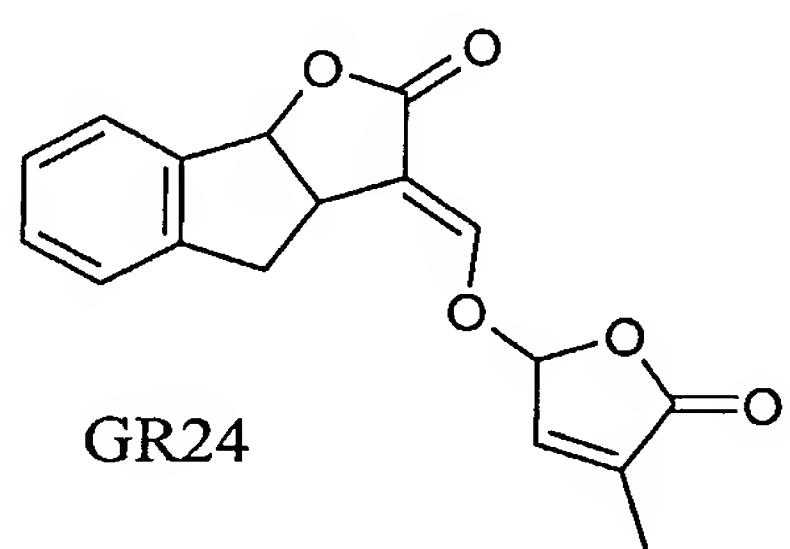
Selon un mode particulier de mise en oeuvre d'un procédé 25 selon l'invention, le traitement des champignons MA -notamment sous forme de spores ou de fragments de racines mycorhizées- est réalisé en milieu aseptique *in vitro*.

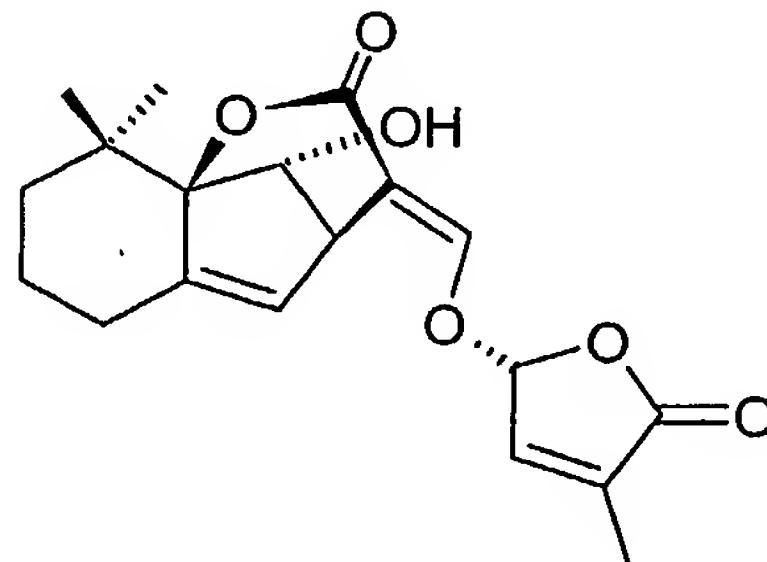
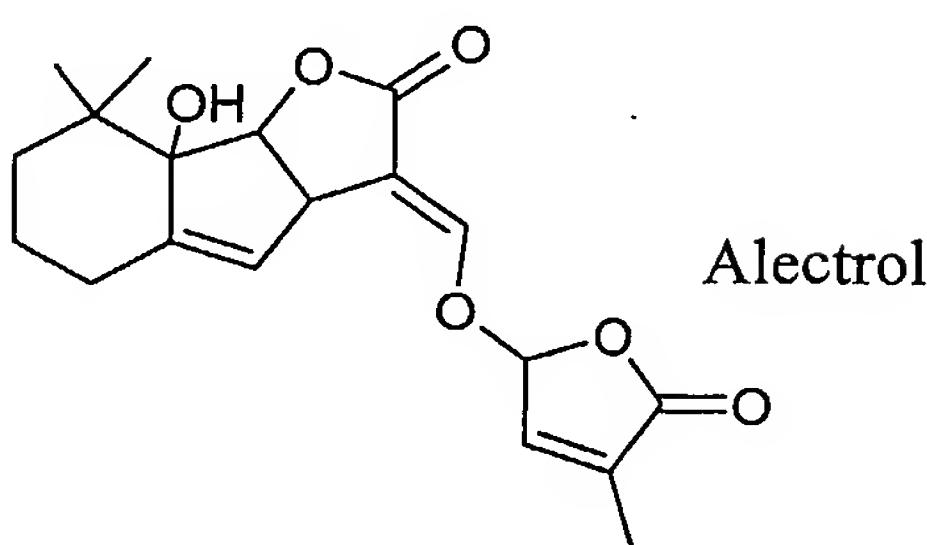
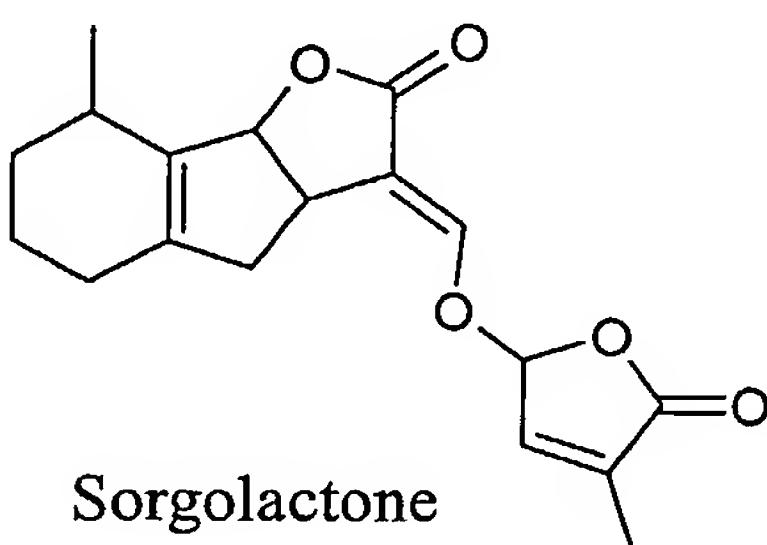
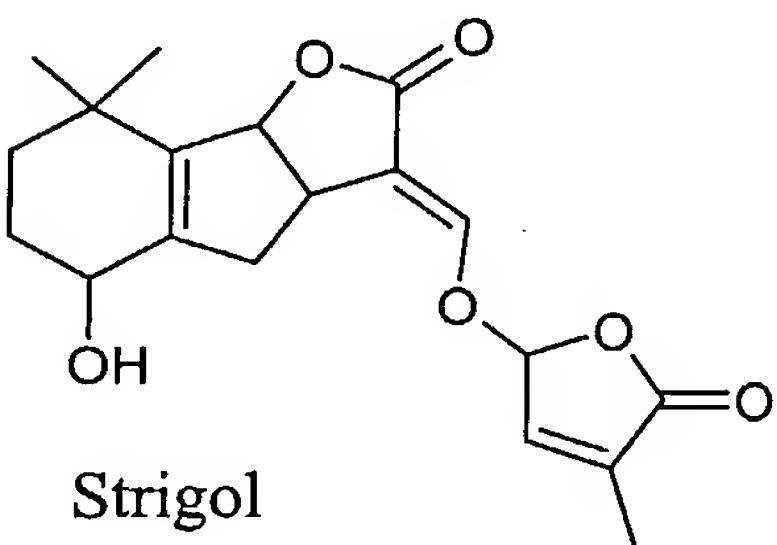
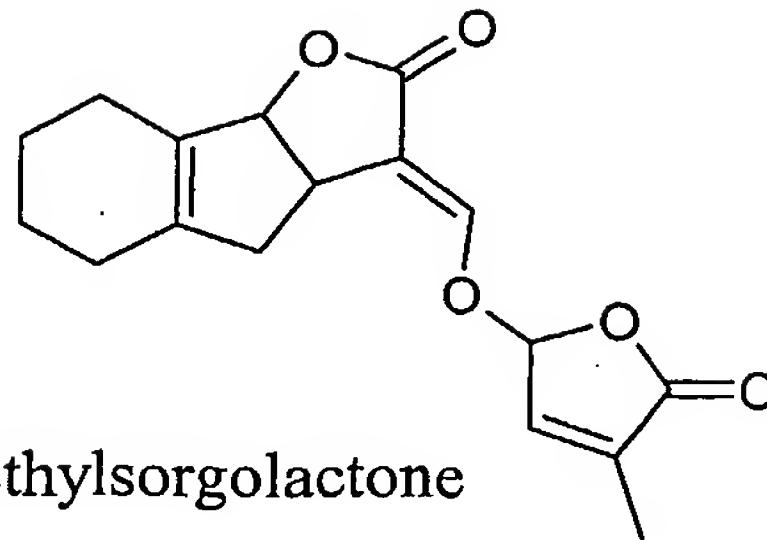
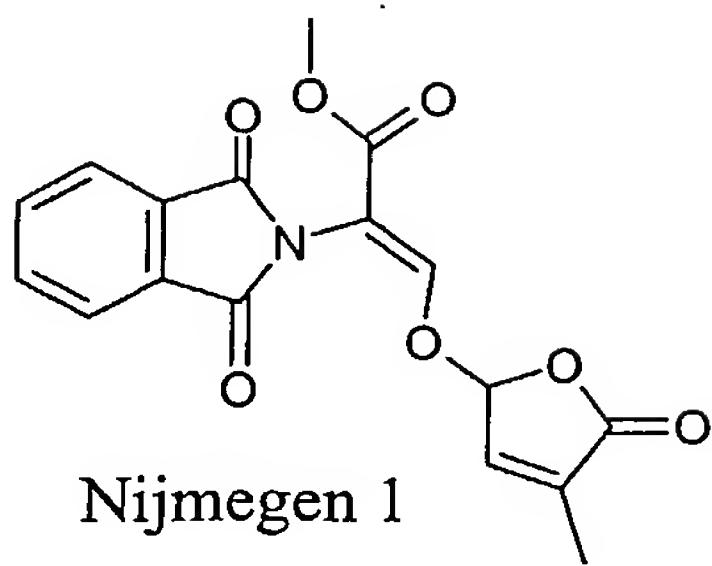
Selon un autre mode de mise en oeuvre d'un procédé selon l'invention, le traitement est avantageusement réalisé sur des cultures de plantes hôtes entières cultivées en pot. Mais, on peut aussi envisager de mettre en oeuvre l'invention à plus grand échelle, notamment sur des plantes hôtes entières 5 cultivées en champ. On utilisera alors préférentiellement des composés de synthèse chimique, comme GR7 et GR24, qui présentent l'avantage, en comparaison avec les strigolactones, de pouvoir être disponibles en quantité suffisante et adaptée pour une application industrielle. Certains de ces composés, comme GR7 et GR24, sont déjà disponibles dans le commerce et/ou peuvent être 10 synthétisés selon des protocoles déjà connus (Mangnus et al., J. Agric. Food Chem., 1992, 40(6):697-700 ; Mangnus et al., J. Agric. Food Chem., 1992, 40(7):1230-1235 ; Thuring et al., J. Agric. Food Chem., 1997, 45(6):2278-2283).

Avantageusement et selon l'invention, on utilise des champignons MA choisis parmi : *Glomus intraradices* et *Gigaspora rosea*.

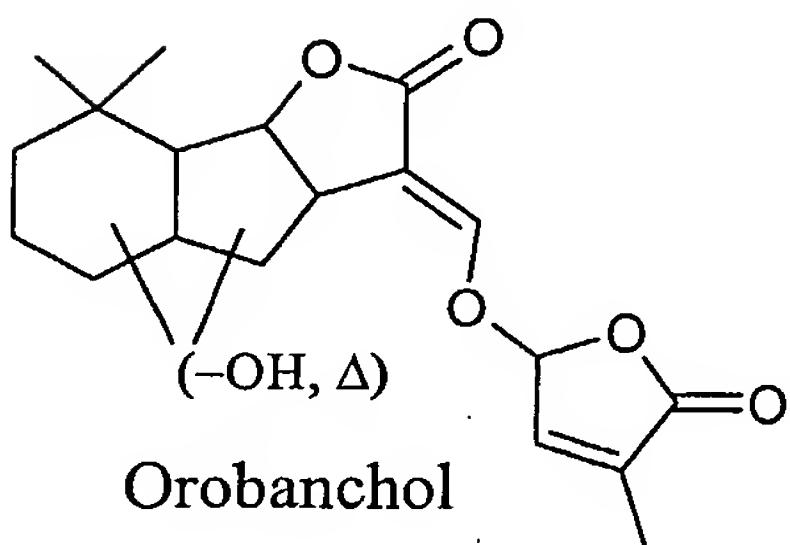
15 L'invention s'étend aussi à un procédé pour produire de l'inoculum de champignons MA. A cet effet, on réalise une co-culture de champignons MA en présence d'une matière végétale vivante, dite plante hôte, correspondant, au moins en partie, à une partie constitutive de racine d'une plante apte à former une symbiose avec des champignons MA.

20 Par ailleurs et selon l'invention, on place également au contact de ladite co-culture, au moins une quantité adaptée pour pouvoir stimuler le développement et/ou la croissance desdits champignons MA, d'au moins un agent de stimulation de structure choisie parmi :





5



Avantageusement et selon l'invention, les champignons

MA de ladite co-culture sont traités par un procédé de traitement de champignons
MA -notamment sous forme de spores- conforme à au moins un des modes
opératoires précédemment décrits.

De manière plus générale, l'invention peut
avantageusement s'inscrire dans le cadre des problématiques de recherche visant
à potentialiser la richesse minérale et hydrique naturelle des sols cultivables,
essentiellement pour réduire l'usage habituel d'engrais chimiques, souvent
sources de pollution par les phosphates et les nitrates.

15

L'invention, par la mise en évidence de facteurs dont certains sont déjà disponibles dans le commerce et capables de stimuler le développement et/ou la croissance des champignons MA, rend ainsi possible la mise en oeuvre, avantageusement à grande échelle, notamment à échelle industrielle, des techniques de mycorhization imaginées il y a plusieurs années mais dont l'application a été, jusqu'à présent, limitée par la faible disponibilité des spores et des autres formes d'inoculum de champignons MA, et par une méconnaissance de facteurs stimulant efficaces et facilement accessibles.

L'invention porte ainsi également sur un procédé de culture 10 d'une plante hôte -en particulier, d'intérêt agronomique ou forestier- apte à former une symbiose avec des champignons MA. Pour ce faire, on réalise dans le milieu de culture un apport d'au moins un agent de stimulation du développement et/ou de la croissance des champignons MA choisi parmi : GR24, GR7, Nijmegen-1, la déméthylsorgolactone, le strigol, l'alectrol, la sorgolactone, l'orobanchol et leurs 15 analogues structuraux.

Selon l'invention, l'apport de l'agent de stimulation est réalisé lors du semis des graines de la plante hôte à cultiver et/ou ultérieurement audit semis.

Dans le cas de la transplantation en terre de jeunes plantes 20 préalablement obtenues (par exemple, par bouturage, microbouturage, marcottage, multiplication *in vitro*,...), l'apport de l'agent de stimulation au milieu de culture (sol de culture) est réalisé lors de ladite transplantation.

Avantageusement et selon l'invention, la plante hôte est cultivée en champ. Elle peut également être cultivée sous serre.

25 Lorsque la plante hôte est cultivée en champ, il se peut très bien que le sol utilisé contienne naturellement des champignons MA en quantité suffisante. Il n'est alors pas nécessaire de supplémenter d'avantage le champ en ces micro-organismes. Toutefois, il peut s'avérer qu'une telle supplémentation soit nécessaire, sous forme de spores ou autre forme d'inoculum de 30 champignons MA.

Avantageusement et selon l'invention, on supplémente le sol en inoculum de champignons MA, notamment lors du semis, et/ou on procède à un apport répété d'agents de stimulation du développement et/ou de la croissance des champignons MA -notamment jusqu'à la récolte-.

5 Avantageusement et selon l'invention, pour la mise en culture, on utilise des semences de la plante hôte, encapsulées avec les agents de stimulation précédemment évoqués, au moyen d'un enrobage en un matériau adapté pour permettre le développement de plantules de ladite plante hôte et la libération desdits agents de stimulation, essentiellement lors des premiers
10 arrosages.

L'invention s'étend à une composition comprenant en combinaison, une quantité de semence d'une plante hôte apte à former une symbiose avec des champignons MA, et une quantité d'agent de stimulation du développement et/ou de la croissance des champignons MA choisi parmi : GR24,
15 GR7, Nijmegen-1, la déméthylsorgolactone, le strigol, l'alectrol, la sorgolactone, l'orobanchol et des analogues structuraux de ceux-ci.

Avantageusement et selon l'invention, ladite composition est formulée de façon à former un enrobé au moyen d'un matériau apte à se désagréger par contact avec un solvant, notamment l'eau.

20 Avantageusement, une composition selon l'invention comprend également une quantité de champignons MA, en particulier sous forme de spores -notamment de *Glomus intraradices* ou de *Gigaspora rosea*-.

L'invention porte également sur une composition comprenant en combinaison une quantité d'inoculum de champignons MA, en
25 particulier des spores, et une quantité d'agent de stimulation du développement et/ou de la croissance des champignons MA choisi parmi : GR24, GR7, Nijmegen-1, la déméthylsorgolactone, le strigol, l'alectrol, la sorgolactone, l'orobanchol et des analogues structuraux de ceux-ci.

Avantageusement et selon l'invention, ladite composition
30 est formulée de façon à former un enrobé au moyen d'un matériau apte à se désagréger par contact avec un solvant, notamment l'eau.

L'invention concerne aussi un procédé de traitement de champignons MA, un procédé pour produire de l'inoculum de champignons MA, un procédé de culture d'une plante hôte ainsi qu'une composition, caractérisés en combinaison par tout ou partie des caractéristiques ci-dessus et ci-après.

5 D'autres buts, caractéristiques et avantages de l'invention pourront également apparaître à la lecture de la description des analyses expérimentales suivantes.

Analyse 1 : Effet de GR24 sur l'activation de la respiration cellulaire de *Glomus intraradices*.

10 Des mesures polarographiques de la consommation d'oxygène ont été effectuées sur des spores de *Glomus intraradices* en germination, en présence ou non de GR24.

15 Pour ce faire, des spores de *Glomus intraradices* sont mises à germer dans du milieu minimum liquide, dit milieu M (le Tableau 1, ci-après, en présente la composition), pendant une semaine, à 30°C et dans une atmosphère enrichie à 2 % en CO₂. Par essai, on utilise 400 spores dans 1 ml de milieu M.

20 Pour la stimulation des spores, on ajoute à chaque essai 10 µl d'une solution de GR24 à 30 µM dans l'acétone (1 %), soit une concentration finale en GR24 de 0,3 µM. Les témoins reçoivent 10 µl d'acétone (1 %).

25 La consommation en oxygène est mesurée en utilisant une électrode à oxygène, dite électrode de Clark (Hansatech Ltd, Hardwick Industrial, Norfolk, Royaume-Uni), insérée dans une chambre en Plexiglas. L'électrode à oxygène est connectée à un enregistreur calibré entre 0 et 100 % avec l'oxygène atmosphérique.

30 Les spores sont installées dans la chambre et la température est maintenue à 30°C au moyen d'un bain d'eau circulant. Les taux de consommation en oxygène sont lus directement sur l'enregistreur. Les mesures de consommation d'oxygène se font sur 15 minutes, après 4h (série 1) et 5h30 (série 2) de stimulation.

CONSTITUANTS	Concentration finale (mg.l ⁻¹)
MgSO ₄ .7H ₂ O	731
KNO ₃	80
KCl	65
KH ₂ PO ₄	4,8
Ca(NO ₃) ₂ , 4H ₂ O	288
NaFe-EDTA	8
KI	0,75
MnCl ₂ , 4H ₂ O	6
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	2,65
H ₃ BO ₃	1,5
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,13
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0,0024
Glycine	3
Thiamine-HCl	0,1
Pyridoxine	0,1
Acide nicotinique	0,5
Myoinositol	50
Milieu complémenté en saccharose	10 g.l ⁻¹

Tableau 1

Deux séries d'expérience indépendantes ont été réalisées.

5 Pour chacune, les valeurs rapportées correspondent à la moyennes de 3 essais. Les résultats obtenus sont rapportés dans le Tableau 2 ci-après.

L'augmentation de la consommation en oxygène est exprimée en pourcentage par rapport à celle du témoin, traité à l'acétone.

	% de stimulation (moyenne sur 3 essais)
Série 1	29,0
Série 2	76,6

Tableau 2

Analyse 2 : Effet de GR7 sur l'activation de la respiration cellulaire de *Gigaspora rosea*.

15 Les expériences réalisées à l'oxygraphe dans les mêmes conditions qu'avec GR24 montrent que GR7 est actif sur la respiration de *Gigaspora rosea* à 0,1 µM final, après 5 heures de stimulation.

Le témoin est réalisé avec 10 µl de méthanol/eau (v/v) par ml de milieu.

Deux séries d'expérience indépendantes ont été réalisées, après 4h (série 1) et 5h30 (série 2) de stimulation.

Pour chacune, les valeurs rapportées correspondent à la moyennes de 3 essais. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau 3 ci-après.

% de stimulation (moyenne sur 3 essais)	
Série 1	24,0
Série 2	33,6

Tableau 3

10 Analyse 3 : Effet de GR24 sur la stimulation de la ramification des hyphes de *Gigaspora rosea*.

La ramification stimulée des hyphes (apparition de nouveaux apex) est le test couramment employé pour évaluer l'activité stimulatrice de différents effecteurs sur les champignons endomycorhiziens du 15 genre *Gigaspora*. Ce phénomène se produit naturellement à proximité des racines de plantes hôtes, ainsi que sous l'action des exsudats racinaires, et est considéré comme une phase préparatoire à la mise en place de la symbiose (Buée et al., Molecular Plant-Microbe Interaction, 2000, 13:693-698). Cette augmentation de ramification résulte d'une stimulation du métabolisme fongique, et conduit à une 20 augmentation des points de contact entre le champignon et les racines de la plante. Toute augmentation de la ramification des hyphes du champignon augmente la mycorhization.

Des mesures de ramification (exprimées en nombre d'apex apparus après stimulation) des tubes germinatifs de *Gigaspora rosea* ont été 25 réalisées en présence de différentes concentrations de GR24.

Pour ce faire, des spores de *Gigaspora rosea* sont mises à germer dans du milieu M gélosé (milieu M comprenant 0,4 % (p/v) de Phytigel® -SIGMA, France-), pendant 5 jours, à 30°C et dans une atmosphère enrichie à 2 % en CO₂. 10 µl d'agents à tester (en concentration variant de 10⁻⁸ à 10⁻¹⁵ M) en

solution dans du méthanol 50 % sont alors apportés dans le milieu par adjonction dans un puits creusé dans la gélose.

Les témoins reçoivent dans les mêmes conditions, le solvant des molécules à tester (10 µl de méthanol à 50 %).

5 48 heures après le traitement, les apex formés au-dessus de la zone de stimulation sont comptabilisés. Deux séries d'expérience avec GR24, à différentes concentrations, ont été réalisées. Les résultats sont présentés dans le Tableau 4 ci-après.

Concentration en GR24 (M)	Nombre de spores traitées	Nombre d'apex néoformés	Apex/spore	Facteur de stimulation
Série 1				
Témoin	2	6	3,0	1,0
10^{-15}	4	15	3,8	1,3
10^{-12}	4	36	9,0	3,0
10^{-10}	3	45	15,0	5,0
10^{-8}	4	65	16,3	5,4
Série 2				
Témoin	2	7	3,5	1,0
10^{-15}	2	17	8,5	2,4
10^{-12}	4	34	8,5	2,4
10^{-10}	3	40	13,3	3,8
10^{-8}	1	14	14,0	4,0

10 Tableau 4

15 Des doses submicromolaires de GR24 conduisent à une stimulation de la ramification d'un facteur 5. Avec des doses inférieures au picomolaire, on observe encore un effet stimulateur manifeste.

Analyse 4 : Effet de GR7 sur la stimulation de la ramification d'hyphe de *Gigaspora rosea*.

20 Des spores de *Gigaspora rosea* sont mises à germer dans un milieu M gélosé, pendant 5 jours à 30°C et dans une atmosphère enrichie à 2 % en CO₂. 10 µl de solution d'agents à tester sont alors apportés dans le milieu par adjonction dans un puits creusé dans la gélose, à partir d'une solution de concentration variant de 10⁻⁵ à 10⁻¹¹ M en agent à tester. Les témoins reçoivent dans les mêmes conditions, uniquement le solvant des agents à tester (10 µl de méthanol à 50 %).

Les apex formés sont comptabilisés au terme de 48 heures de traitement. Par ailleurs, l'activité d'elongation est évaluée par mesure du nombre de cm formés avant et après traitement. Deux séries d'expérience, à différentes concentrations de GR7, ont été réalisées. Les résultats obtenus sont 5 présentés dans le Tableau 5 ci-après.

Concentration en GR7 (M)	Nombre de spores traitées	Nombre d'apex néoformés	Rapport de stimulation des ramifications	cm néoformés/ spore	Rapport de stimulation de la croissance
Série 1					
Témoin	4	1,75		1,1	1,00
10^{-11}	6	5,16	2,94	2,65	2,41
10^{-9}	5	8	4,57	2,62	2,38
10^{-7}	4	8,75	5	4,65	4,23
10^{-5}	6	9,3	5,31	4,88	4,44
Série 2					
Témoin	6	2,16		2,49	1,00
10^{-11}	3	2,66	1,23	2,23	0,89
10^{-9}	6	6,16	2,85	4,99	2,00
10^{-7}	7	10,42	4,82	5,09	2,04
10^{-5}	4	14,25	6,59	6,5	2,60

Tableau 5

On constate que des doses de l'ordre du nanomolaire de 10 GR7 sont significativement actives sur la ramification (nombre d'apex nouvellement formées) et sur l'elongation cellulaire.

Analyse 5 : Effet de GR7 sur la mycorhization de *Medicago truncatula* par *Gigaspora rosea*.

Des mesures du nombre de points de contact établis entre le 15 champignon et les racines lors d'expériences de mycorhization *in vitro* ont été effectuées. Des plantes de *Medicago truncatula* ont été cultivées *in vitro* en présence de spores de *Gigaspora rosea*, sur du milieu M enrichi en GR7.

Pour les essais, du milieu M préparé comme précédemment est enrichi avec du GR7 à 0,1 μ M en concentration finale. Les témoins sont 20 réalisés avec du milieu M dans lequel du méthanol est ajouté à 0,1 % en concentration finale. Le milieu est coulé dans des boîtes de Petri carrées (100x100). Trois boîtes témoins et trois boîtes essais sont préparées. Les spores

de *Gigaspora rosea* sont mises à pré-germer dans ces boîtes (25 par boîte) à l'étuve à 30°C, à 2 % en CO₂, pendant 6 jours. Les graines de *Medicago truncatula* sont stérilisées à l'eau de Javel à 8 degrés chlorimétrique pendant 5 minutes. Après rinçage à l'eau distillée stérile, elles sont mises à germer sur un 5 milieu constitué d'Agar bactériologique de 1 µM de gibbérelline. Après 24 heures à 4°C, elles sont transférées dans une enceinte à 25°C pendant 24 heures. Dix huit plantules ainsi préparées sont alors réparties au hasard dans les six boîtes expérimentales contenant les spores en train de germer. Les boîtes sont disposées verticalement en chambre de culture (22°C, photopériode 16h/8h) pendant 10 3 semaines. Les plantules sont récoltées et les systèmes racinaires colorés à l'encre selon le protocole de Vierheilig (Vierheilig et al., Appl. Environ. Microbiol., 1998, 64:5004-5007).

Le nombre de points de contact établis entre le champignon et les racines est comptabilisé plante par plante après observation au microscope.

15 Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 6 ci-après :

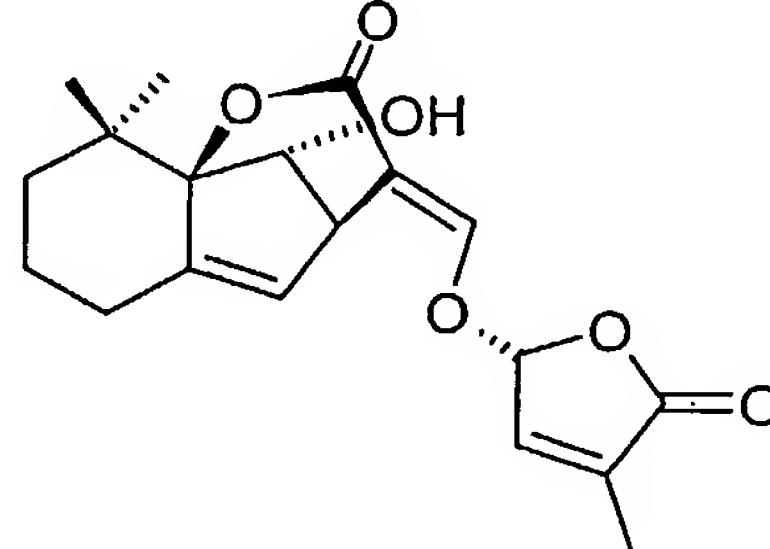
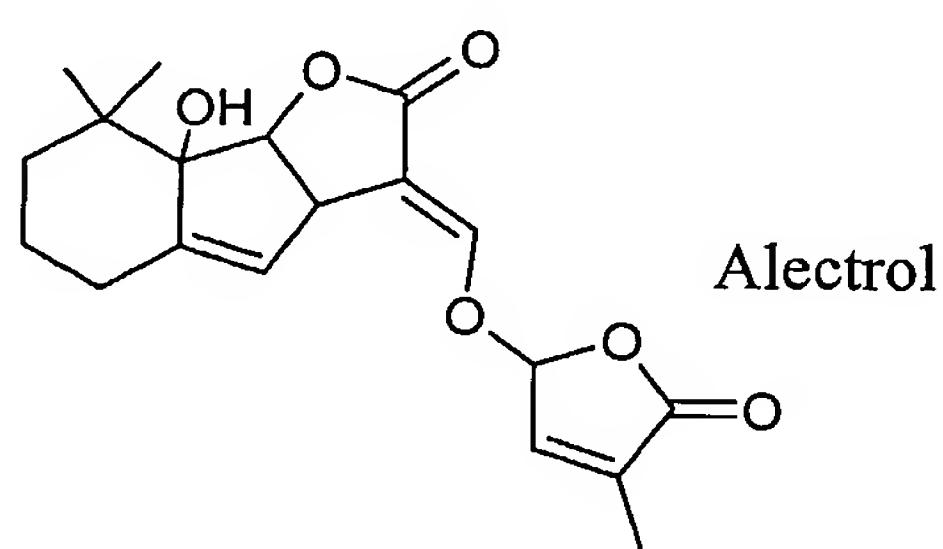
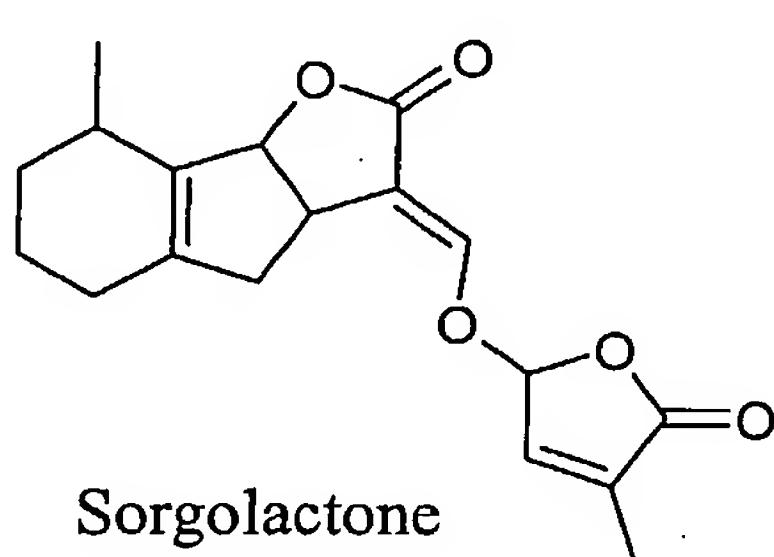
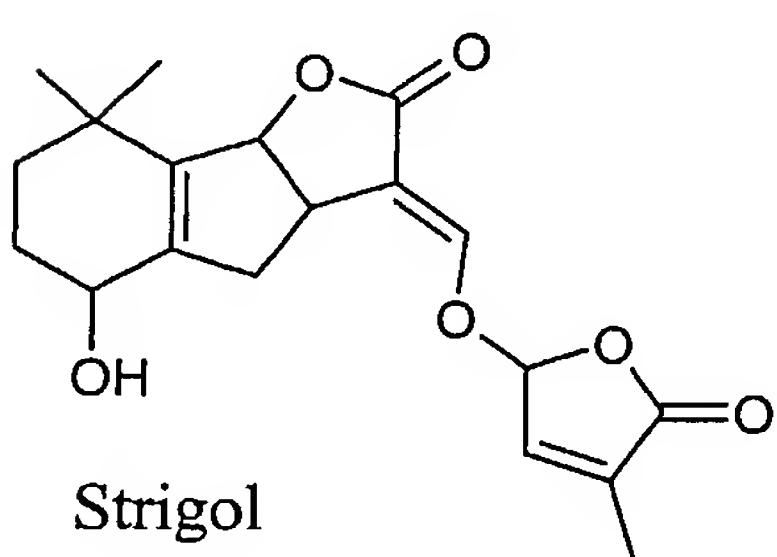
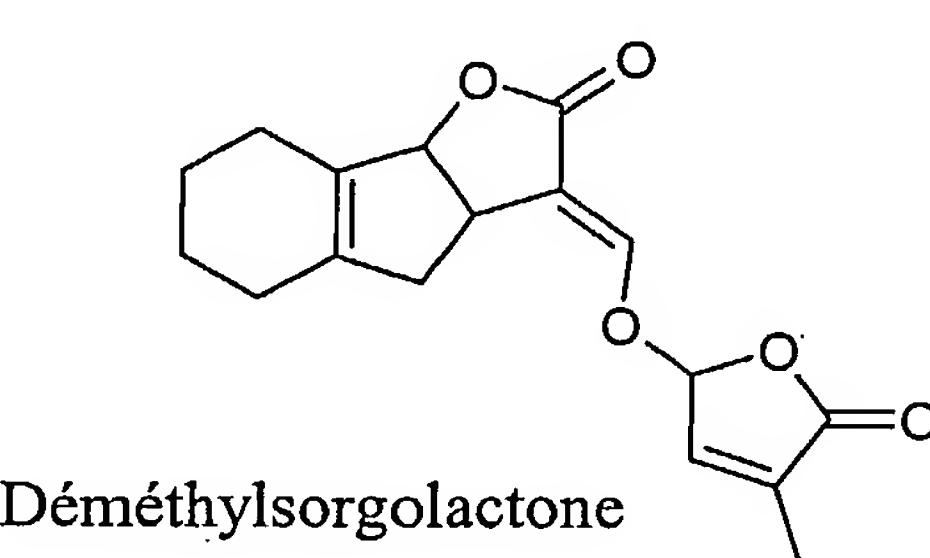
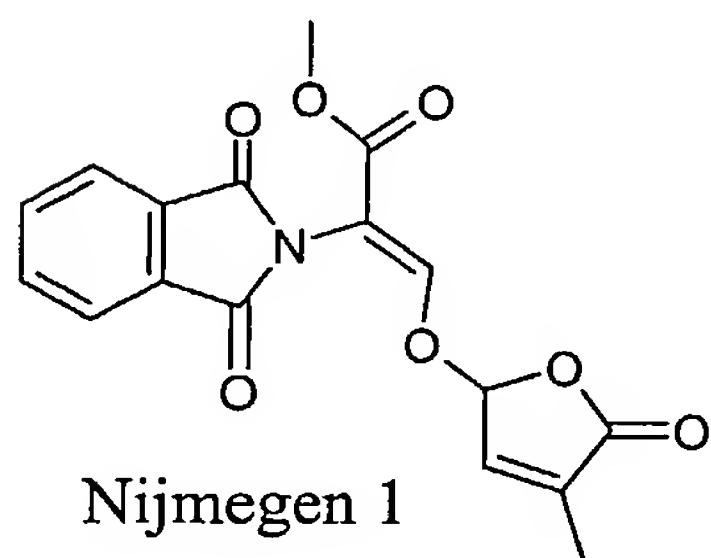
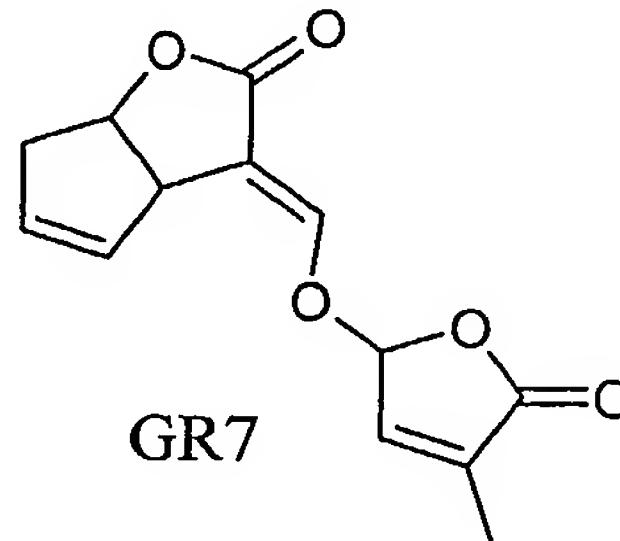
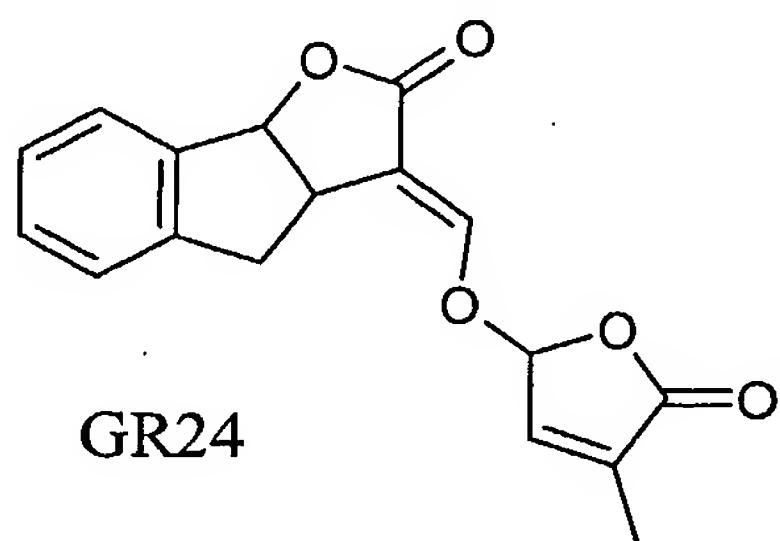
	Nombre de plantes	Moyenne des points de contact	SEM
Témoin (méthanol)	10	2,2	0,8
Essai (GR7)	8	7,75*	2,11

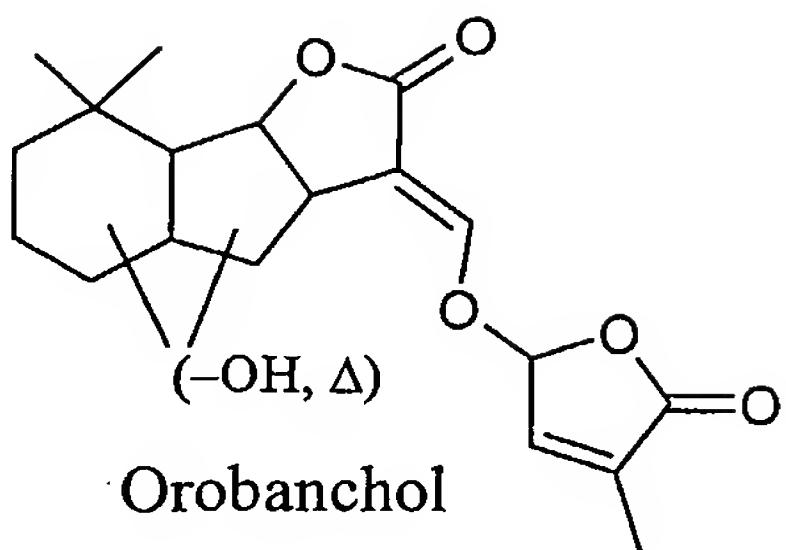
* Moyenne significativement différente (P=0,02, test de Mann-Whitney)

Tableau 6

REVENDICATIONS

1/ Procédé de traitement de champignons mycorhiziens à arbuscules, dits champignons MA, dans lequel on place au contact des champignons MA, au moins une quantité adaptée pour pouvoir stimuler le 5 développement et/ou la croissance desdits champignons MA, d'au moins un agent de stimulation de structure choisie parmi :





2/ Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on réalise ledit procédé sur des champignons MA sous forme de spores.

5 3/ Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on réalise ledit procédé sur des fragments de racines mycorhizées.

10 4/ Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'on réalise ledit traitement des champignons MA en présence d'une matière végétale vivante, dite plante hôte, correspondant, au moins en partie, à une partie constitutive de racine d'une plante apte à former une symbiose avec des champignons MA.

5/ Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'on réalise ledit traitement en milieu aseptique *in vitro*.

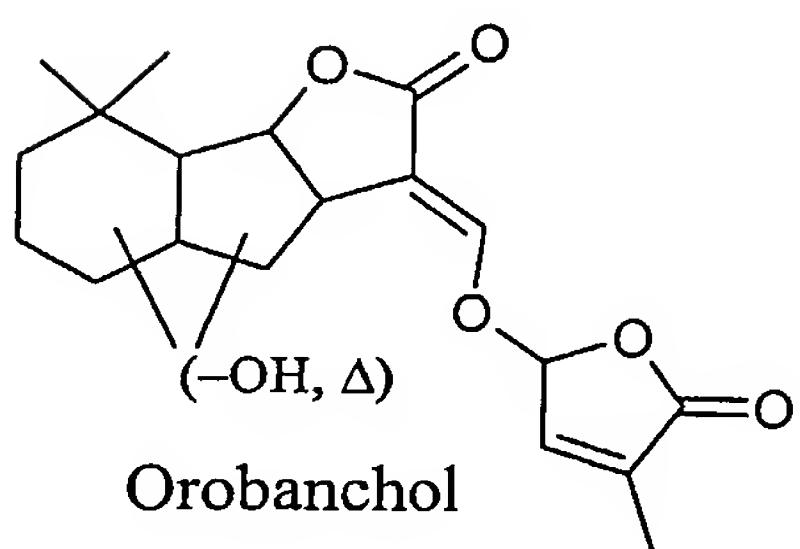
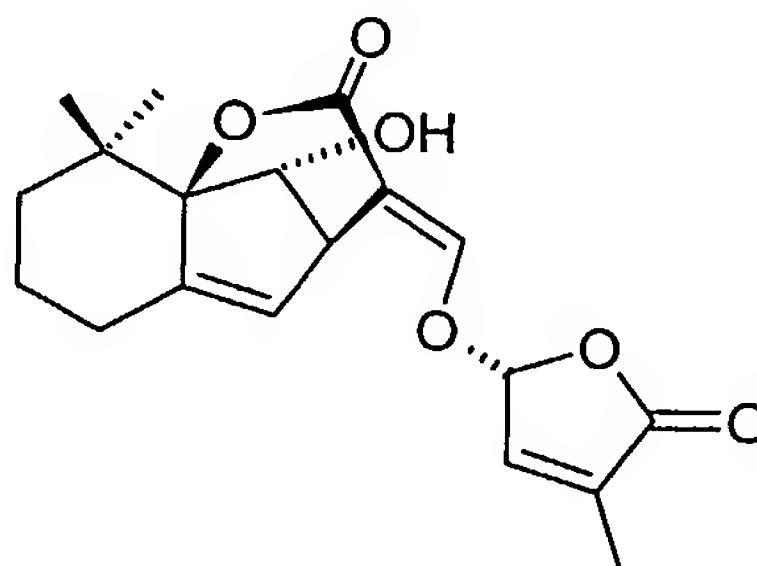
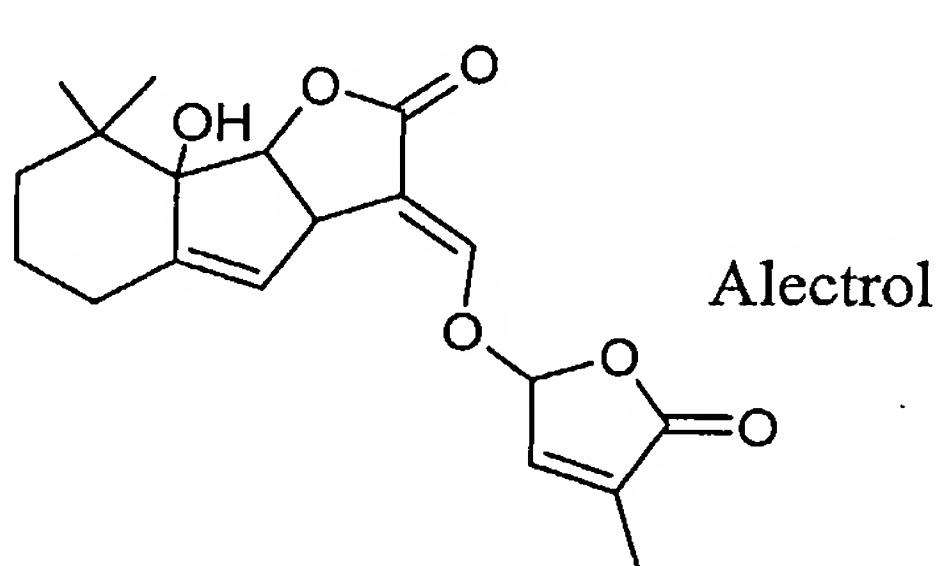
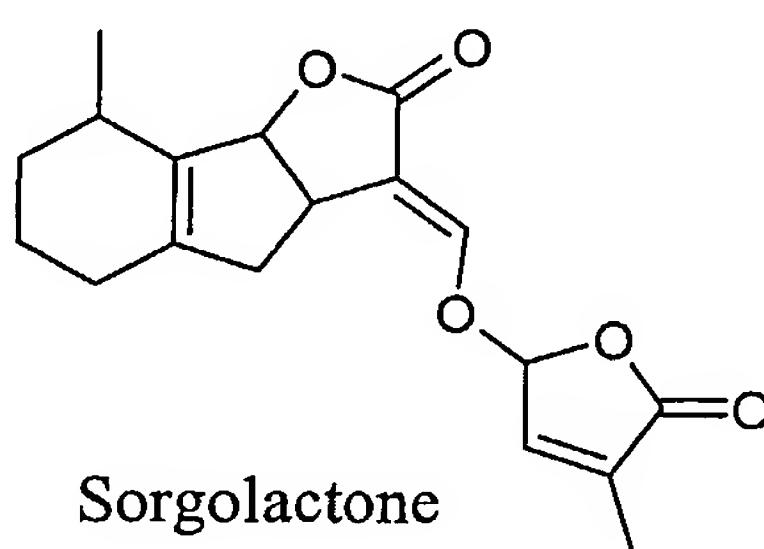
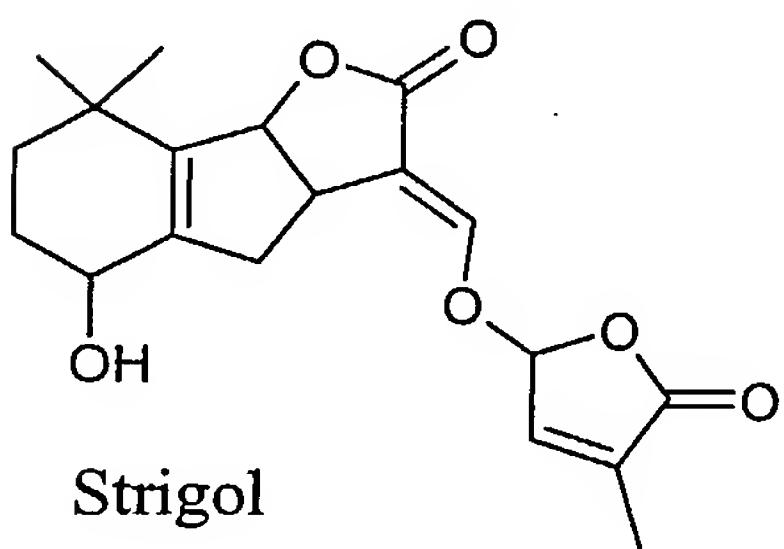
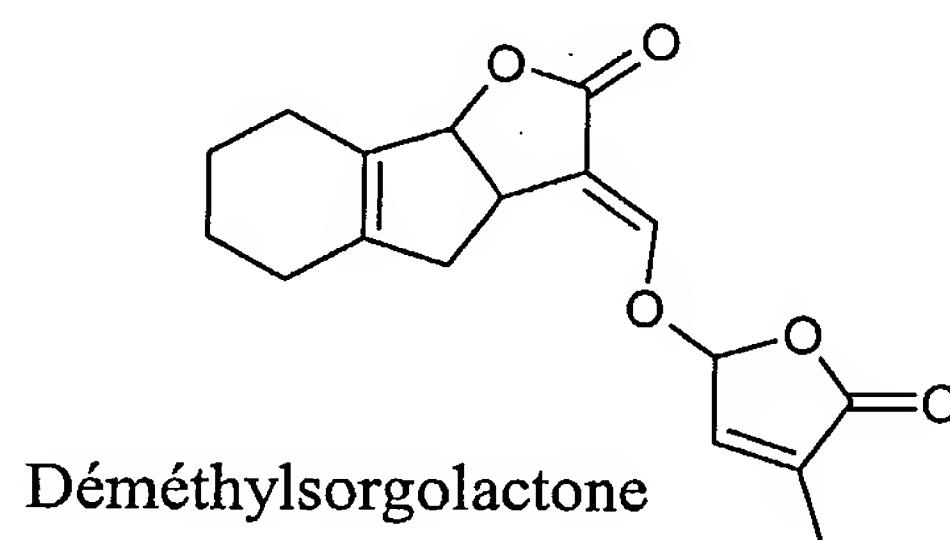
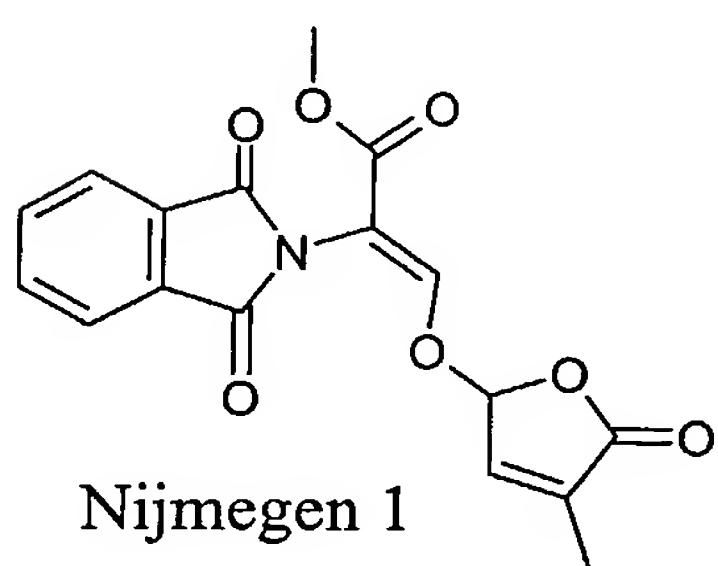
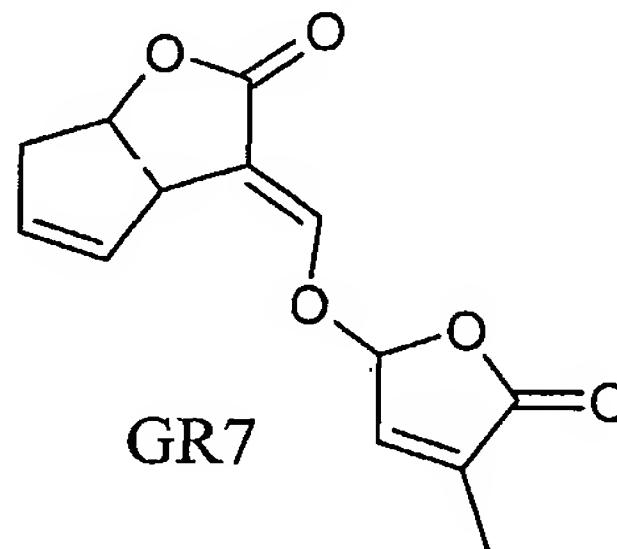
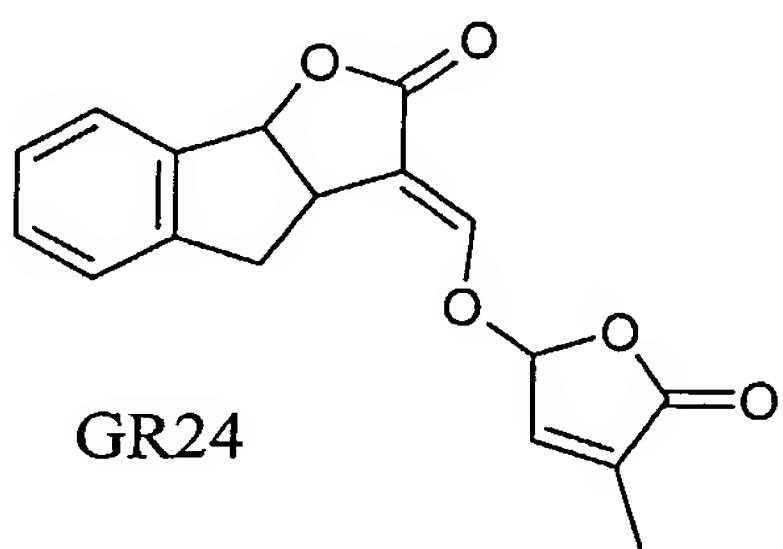
15 6/ Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'on réalise ledit traitement sur au moins une plante hôte entière cultivée en pot.

7/ Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'on réalise ledit traitement sur au moins une plante hôte entière cultivée en champ.

20 8/ Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'on utilise des champignons MA choisis parmi : *Glomus intraradices* et *Gigaspora rosea*.

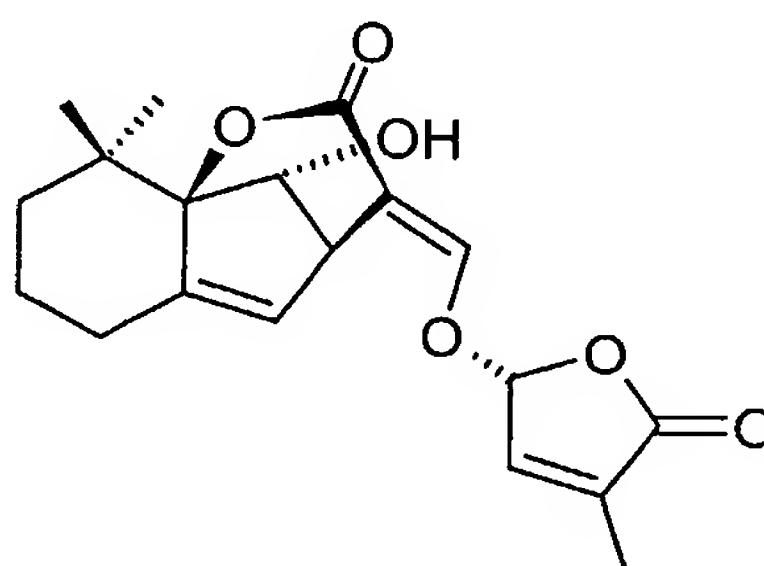
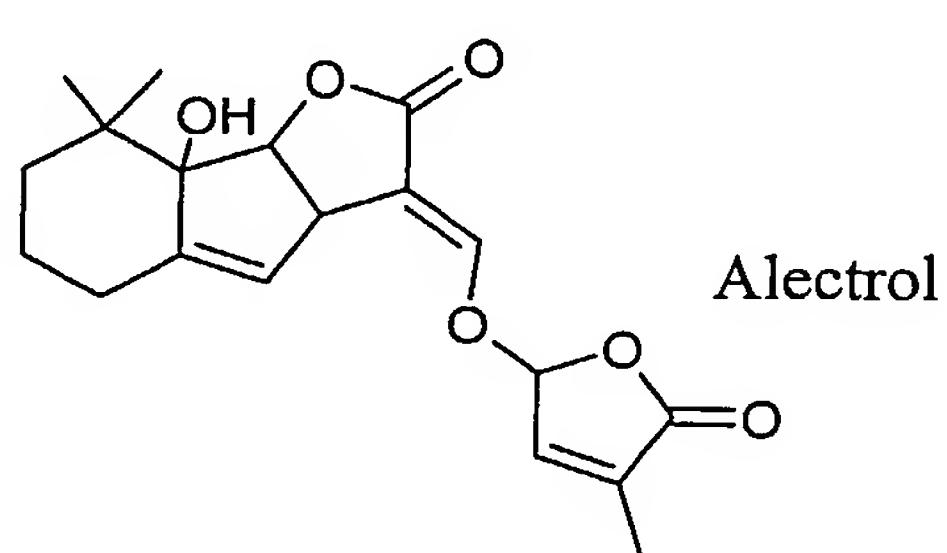
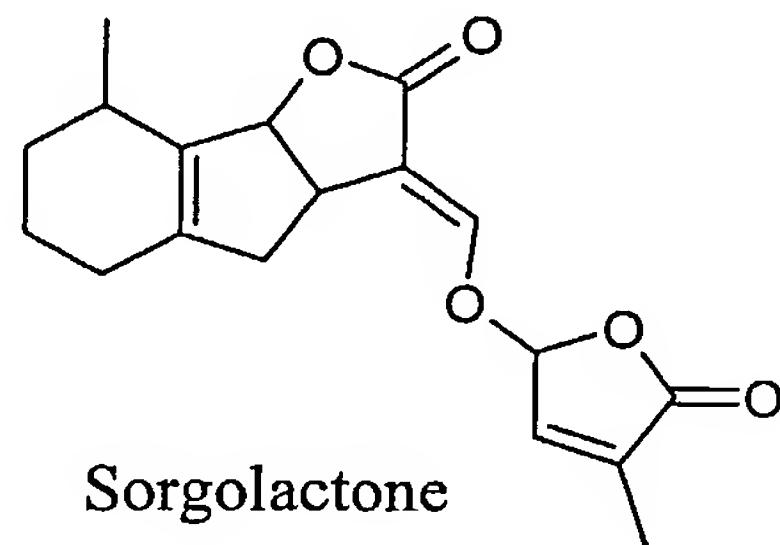
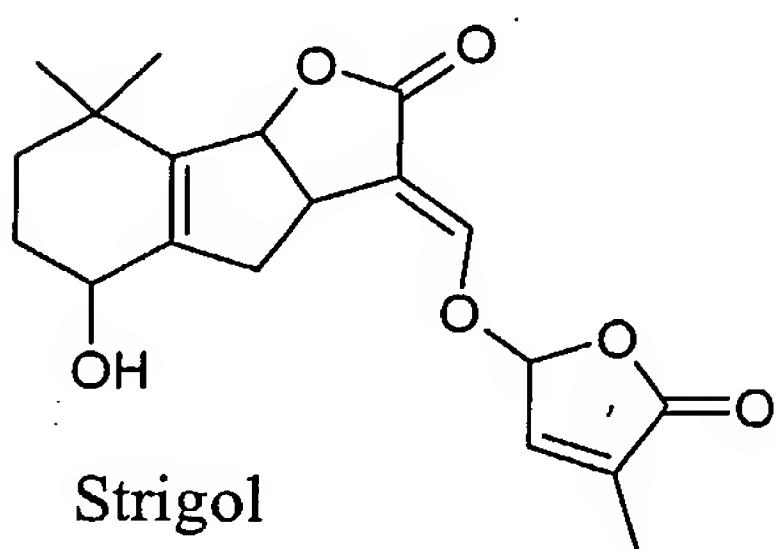
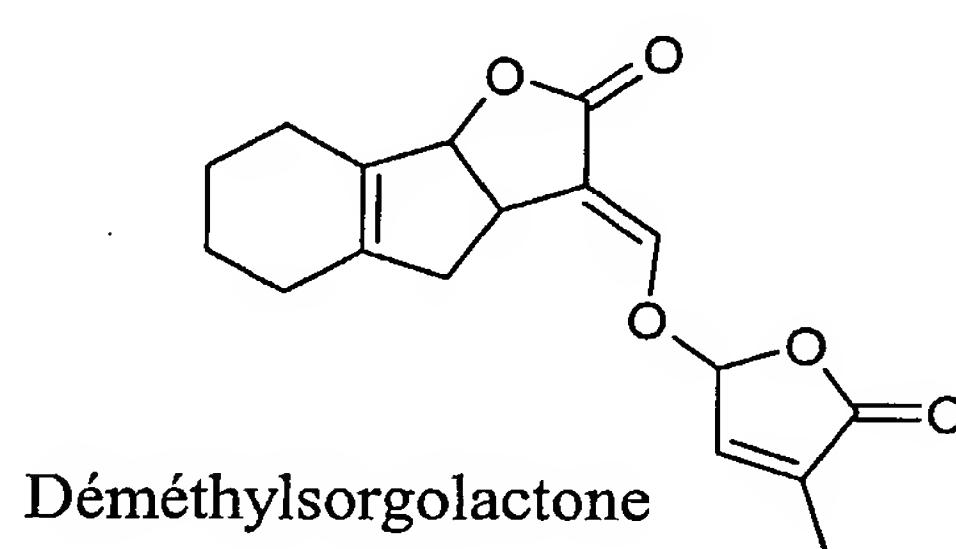
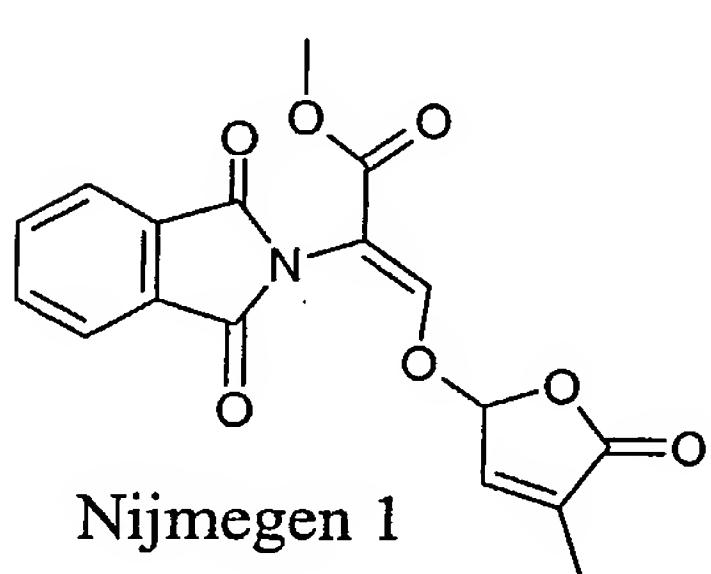
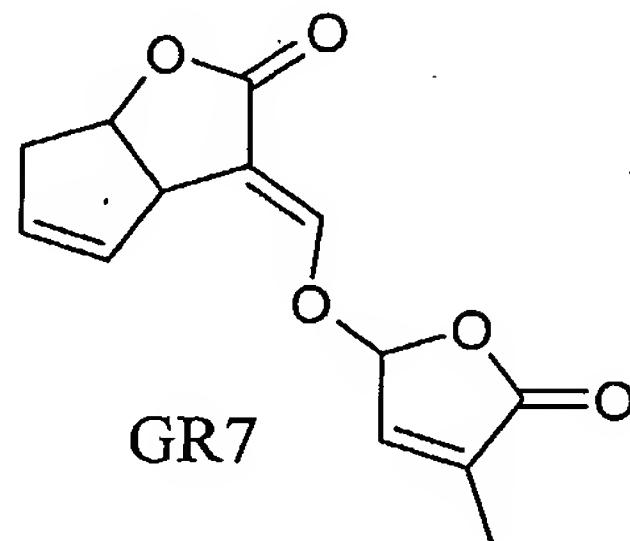
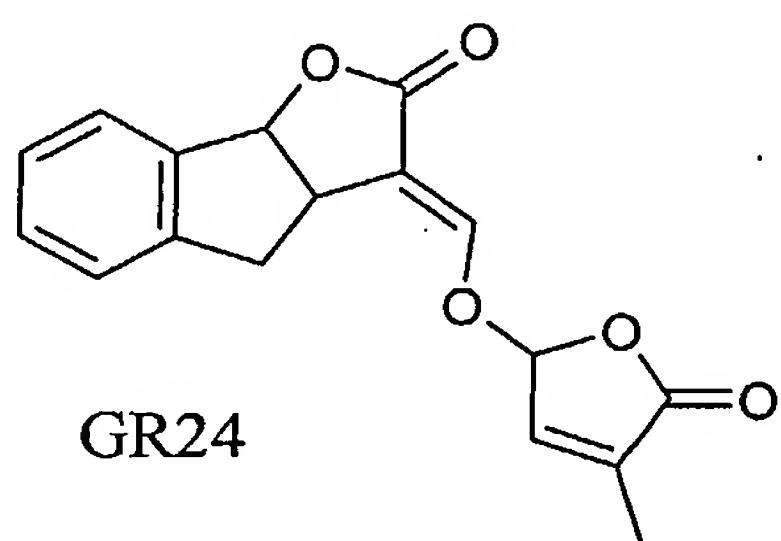
25 9/ Procédé pour produire de l'inoculum de champignons mycorhiziens à arbuscules, dits champignons MA, dans lequel on réalise une co-culture de champignons MA en présence d'une matière végétale vivante, dite plante hôte, correspondant, au moins en partie, à une partie constitutive de racine d'une plante apte à former une symbiose avec des champignons MA,

caractérisé en ce qu'on place également au contact de ladite co-culture, au moins une quantité adaptée pour pouvoir stimuler le développement et/ou la croissance desdits champignons MA, d'au moins un agent de stimulation de structure choisie parmi :



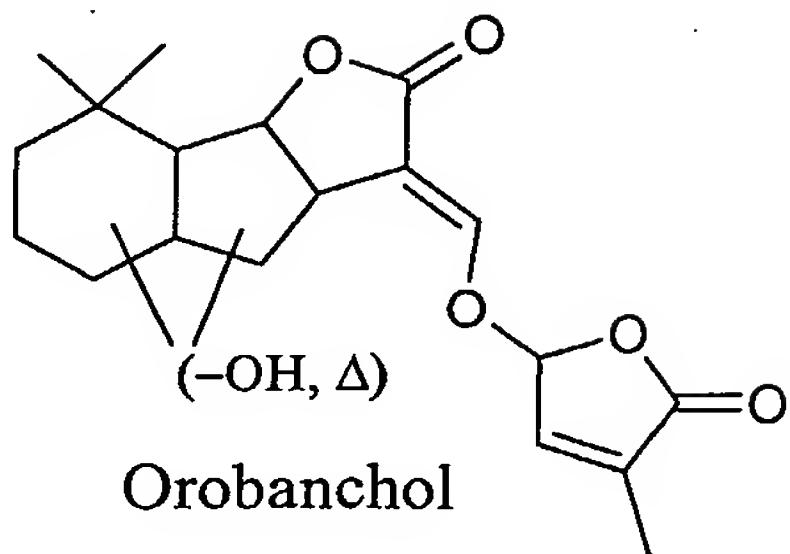
10/ Procédé selon la revendication 9, dans lequel on traite les champignons MA de ladite co-culture par un procédé selon l'une des revendications 1 à 8.

11/ Procédé de culture d'une plante hôte apte à former une symbiose avec des champignons mycorhiziens à arbuscules, dits champignons MA, dans lequel on réalise sur un sol de culture un apport d'au moins un agent de stimulation du développement et/ou de la croissance des champignons MA choisi parmi :



10

15



caractérisé en ce que ledit apport de l'agent de stimulation est réalisé lors du semis des graines de la plantes hôte à cultiver et/ou ultérieurement audit semis.

12/ Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce
5 que la plante hôte est cultivée sous serre.

13/ Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que la plante hôte est cultivée en champ.

14/ Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que lesdits champignons MA sont naturellement présents sur ledit sol de
10 culture.

15/ Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce qu'on supplémente ledit sol de culture en champignons MA.

16/ Procédé selon l'une des revendications 11 à 15, caractérisé en ce qu'on procède à un apport répété d'agents de stimulation du
15 développement et/ou de la croissance desdits champignons MA.

17/ Composition comprenant en combinaison une quantité de semence d'une plante hôte apte à former une symbiose avec des champignons MA, et une quantité d'agent de stimulation du développement et/ou de la croissance des champignons MA choisi parmi : GR24, GR7, Nijmegen-1, la
20 déméthylsorgolactone, le strigol, l'alectrol, la sorgolactone, l'orobanchol.

18/ Composition selon la revendication 17, caractérisée en ce que ladite composition est formulée de façon à former un enrobé au moyen d'un matériau apte à se désagréger par contact avec un solvant.

19/ Composition selon l'une des revendications 17 ou 18,
25 caractérisée en ce qu'elle comprend également une quantité d'inoculum de champignons MA.

20/ Composition selon la revendication 19, caractérisée en ce qu'il s'agit d'inoculum de champignons MA choisis parmi : *Glomus intraradices* et *Gigaspora rosea*.

21/ Composition comprenant en combinaison, une 5 quantité d'inoculum de champignons MA, et une quantité d'agent de stimulation du développement et/ou de la croissance des champignons MA choisi parmi : GR24, GR7, Nijmegen-1, la déméthylsorgolactone, le strigol, l'alectrol, la sorgolactone, l'orobanchol.

22/ Composition selon la revendication 21, caractérisée 10 en ce que ladite composition est formulée de façon à former un enrobé au moyen d'un matériau apte à se désagréger par contact avec un solvant.